

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**RAZNOLIKOST I ULOGA MIKROBA  
U INTESTINALNOM TRAKTU  
OVJEKA**

**DIVERSITY AND ROLE OF  
MICROBES IN THE HUMAN  
INTESTINAL TRACT**

**SEMINARSKI RAD**

**Nikolina Bolf**  
Preddiplomski studij biologije  
Mentor: prof.dr.sc. Dijana Škori

Zagreb, 2011.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	3
2. MIKROBIOM USNE ŠUPLJINE.....	4
2.1. MIKROORGANIZMI USNE ŠUPLJINE.....	4
2.2. BAZA PODATAKA USNOG MIKROBIOMA.....	5
2.2.1. ANALIZA KLONOVA .....	6
3. CRIJEVNA KOLONIZACIJA MIKROORGANIZAMA U NEDONOŠ ADI.....	7
3.1. GENOMSKA ANALIZA CRIJEVNE KOLONIZACIJE MIKROORGANIZAMA U NEDONOŠ ADI.....	7
3.2. METAGENOMI KA OBRADA PODATAKA.....	9
3.2.1. ANALIZA SOJEVA <i>CITROBACTER</i> .....	10
3.2.2. <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	10
4. UTJECAJ PREHRANE U OBLIKOVANJU CRIJEVNOG MIKROBIOMA KOD DJECE IZ EUROPE I AFRIKE.....	11
4.1. DOMINACIJA <i>BACTEROIDETES</i> U DJECE IZ BURKINE FASO U USPOREDBI S DJECOM IZ ITALIJE .....	11
4.2. OMJER <i>FIRMICUTES</i> / <i>BACTEROIDETES</i> ( F/B) .....	13
4.3. BOGATSTVO MIKROORGANIZAMA I BIOLOŠKA RAZNOLIKOST.....	13
5. UTJECAJ CRIJEVNOG MIKROBIOMA NA RAZVOJ MOZGA I PONAŠANJE.....	14
5.1. UTJECAJ NORADRENALINA (NA), DOPAMINA (DA) I 5-HT-a U STRIJATUMU MIŠEVA.....	14
5.1.1. EKSPRESIJA SINAPTI KO-PLASTI NIH SRODNIH GENA U MIŠEVA ....	15
5.1.2. UTJECAJ MIKROBNE KOLONIZACIJE NA PROTEINSKU EKSPRESIJU U MIŠEVA.....	15
6. ZAKLJU AK .....	16
7. SAŽETAK.....	17
8. SUMMARY .....	18
9. LITERATURA.....	19

## 1. UVOD

Bakterije su jednostanični organizmi za koje se vjeruje da su bili prva živa bića na Zemlji. Prema sistematici čine zasebno carstvo mikroskopskih jednostaničara. Budući da su jednostavne građe te ne posjeduju jezgru i organele ubrajaju se među prokariote. I dok neke uzrokuju bolesti, druge bakterije se normalno razvijaju u našim tijelima, na primjer u probavnom traktu. Od 1500 opisanih vrsta bakterija, samo su stotinjak vrsta ljudski patogeni (<http://vijesti.gorila.hr/gorilopedija/lifestyle/zdravlje/bakterije>).

Pretpostavlja se da postoji preko 500 različitih vrsta bakterija u prosječnom ljudskom intestinalnom traktu. Budući da u intestinalnom traktu nema mnogo kisika, prevladavaju anaerobne bakterije. Procjenjuje se da postoji oko 10-100 trilijuna stanica bakterija u intestinalnom traktu, u tijelu koje nije pod antibioticima te da 10-50 % staničnog volumena otpada na bakterije (<http://dira.forums-free.com/bakterije-mikroorganizmi-u-gastrointestinalnom-traktu-t493.html>).

U ovom radu je literaturno istraženo kako sve bakterije iz intestinalnog trakta mogu utjecati na organizam, koje vrste su zastupljene u organizmu s obzirom na način života te kakve promjene izazivaju. Proučavani su mikroorganizmi iz usne šupljine s ciljem da se svoje unesu u bazu podataka usnog mikrobioma pod nazivom HOMB (*Human Oral Microbiome Database*) te da se identificiraju i da im se odredi brojnost. Također, istraženo je kako bakterije iz intestinalnog trakta utječu na mozak i ponašanje u miševa, zatim koju ulogu imaju prehrambene navike u raznolikosti bakterija kod djece koja žive u različitim kulturama i koje se skupine bakterija uzetih iz fekalnih uzoraka javljaju kod nedonošadi u određene dane, ovisno kako je dijete tretirano.

## 2. MIKROBIOM USNE ŠUPLJINE

Usna šupljina sadržava nekoliko različitih staništa uključujući i zube, jezik, gingivni sulkus, obraze, nepce te krajnike koje su nastanile bakterije. Usni mikrobiom sadržava više od 600 svojti, a one prevladavaju na razini vrste (Dewhirst i sur., 2010).

Prvi cilj ovog istraživanja bio je prikupiti sekvence gena za 16S rRNA u bazu podataka usnog mikrobioma tzv. HOMD. HOMD obuhvaća 619 svojti koje su raspoređene u 13 koljena: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *SRI*, *Synergistetes*, *Tenericutes* i *TM7*. Drugi cilj je bio analizirati 36043 gena za 16S rRNA na kojima su provedena istraživanja te identificirati i odrediti relativnu brojnost svojti (Dewhirst i sur., 2010).

Provodila se analiza 1179 svojti, od kojih su 24% bile imenovane, 8% su bile neimenovane, a 68% ih je bilo neobrađeno. Većina tih svojti su priznate prije svega po svojoj sekvenci gena za 16S rRNA. HOMD nudi "alate" za pretraživanje svih bakterija usnog genoma i javno je dostupan ([www.homd.org](http://www.homd.org)).

### 2.1. MIKROORGANIZMI USNE ŠUPLJINE

Mikroorganizmi koji se nalaze u usnoj šupljini imaju naziv oralna mikroflora, oralni mikrobiota ili oralni mikrobiom. Pojam mikrobiom uveo je Joshua Lederberg, a označava ekološke zajednice u simbiozi te patogene mikroorganizme koji naseljavaju ljudsko tijelo (Dewhirst i sur., 2010).

Definiran je usni mikrobiom kao i svi mikroorganizmi koji se nalaze na ili u usnoj šupljini. Istraživanja su pokazala da su različite oralne strukture i tkiva naselile različite mikrobne zajednice. Mikroorganizmi iz usne šupljine obuhvaćaju uzročnike niza zaraznih bolesti, uključujući i karijes, parodontitis, endodontske infekcije, alveolarni ostitis te anginu (Dewhirst i sur., 2010).

## 2.2. BAZA PODATAKA USNOG MIKROBIOMA

Dakle, u prvom dijelu istraživanja bilo je potrebno razviti privremenu taksonomsku shemu imenovanja za trenutno neimenovane vrste te staviti ove informacije u online-bazu podataka usnog mikrobioma (HOMD) koja će biti javno dostupna. Okosnicu HOMD-a čini set referentnih sekvenci gena za 16S rRNA koje se koriste za definiranje pojedinih svojti u usnoj šupljini te stvaranje filogenetske strukture i taksonomske baze podataka. Po etni referentni skup 16S rDNA za HOMD se sastojao od više od 800 sekvenci. Nakon ulaska i usklađivanja tih sekvenci u bazu podataka DNA, bila su generirana filogenetska stabla. Ukupno 78 filotipova je identificirano i uklonjeno iz baze podataka (Dewhirst i sur., 2010).

Svaki takson dobio je broj usnog taksona (HOT). Postavljanje svojti u više taksone bilo je važno zbog pozicije na filogenetskom stablu. Npr. *Eubacterium saburreum* smješten je u porodicu *Lachnospiraceae*, a ne *Eubacteriaceae*. *E. saburreum* nije usko povezana sa sojem roda *Eubacterium* te će morati biti svrstana u novi rod i kasnije preimenovana (Dewhirst i sur., 2010).

Koljena *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* i *Fusobacteria* sadrže 96 % od svojti, dok preostala koljena: *Euryarchaeota*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *SRI*, *Synergistetes*, *Tenericutes* i *TM7* sadrže ostalih 4 % od svojti. Dakle, ukratko, HOMD sadrži svojte, opis za svaku svojtu, njen status, neimenovane ili neobrađene filotipove, referentni broj soja te linkove. Sadrži također i BLASTN "alat" za identifikaciju sekvenci 16S rDNA izolata klonova (Dewhirst i sur., 2010).

### 2.2.1. ANALIZA KLONOVA

Za potvrđivanje i proširivanje svojti uključujući u HOMD te bolje razumijevanje raznolikosti i raspodjele svojti usnog mikrobioma, analizirano je 36043 gena za 16S rRNA. Klonovi su pronađeni u 11 od 13 koljena bakterija uključujući u HOMD. Pronađeni su klonovi za bakterijska koljena: *Deinococcus* (3 klona), *Acidobacteria* (1 klon) i *Cyanobacteria* (1 klon).

Klonovi ovih koljena mogu predstavljati prijelazno egzogene bakterije. Devetnaest klonova koji su otkriveni predstavljaju 4 biljke (kloroplasti). Kako ljudi jedu biljke, sekvence 16S rDNA biljnih kloroplasta otkriveni su i u usnoj šupljini. Identificirani su geni pšenice (*Triticum aestivum*) i manioke (*Manihot esculenta*). *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Fusobacteria* su mikrobiološke zajednice koje čine između 29% i 50 % svojti mikrobioma usne šupljine. Manje od 12 % svojti čine *Spirochaetes* i *Synergistetes*. *TM7*, *SR1* i *Chloroflexi* nisu zastupljeni ili je *SR1* prisutan u omjeru 1/5000 (Dewhirst i sur., 2010).

### 3. CRIJEVNA KOLONIZACIJA MIKROORGANIZAMA U NEDONOŠ ADI

Crijevni mikrobiom je kriti na odrednica ljudskog zdravlja. Promjene u njegovom sastavu su rezultirale kroničnim bolestima kao npr. pretilost te upalne bolesti crijeva, a mogu biti povezane i s neonatalnim nekrotizirajućim enterokolitisom u nedonošađadi. Iako je crijevni mikrobiom odraslih vrlo promjenjiv između pojedinaca, pokazuje ograničenu raznolikost na razini reda: tek dvije bakterijske skupine (*Bacteroidetes* i *Firmicutes*) čine oko 90% svih mikroorganizama u tom mikrobiomu. Kod dojenika, skupine crijevnih mikrobioma povezane su s razvojem urođenog imunog odgovora i terminalne diferencijacije crijeвне strukture. Tek nakon prvog tjedna života u crijevu novorođenčeta uspostavi se stabilna bakterijska flora (Morowitz i sur., 2010).

Normalnu zdravu mikrofloru čine rodovi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Takva mikroflora rijetko se nalazi u nedonošađadi, dapače, u njih je uobičajen nalaz opasnih-patogenih bakterija kao *Enterococcus*, *Staphylococcus* ili *Enterobacteriaceae* (<http://www.zdrav-zivot.com.hr/index.php?cat=probiotici>).

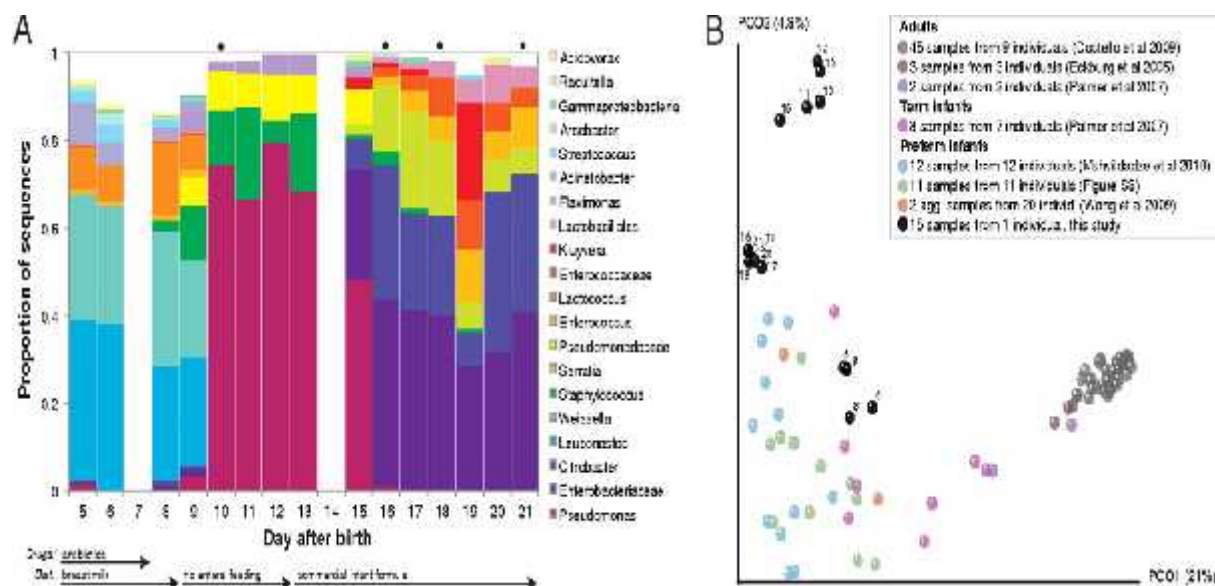
#### 3.1. GENOMSKA ANALIZA CRIJEVNE KOLONIZACIJE MIKROORGANIZAMA U NEDONOŠ ADI

Istraženi su fekalni uzorci ženskog dojenčeta rođenog carskim rezom u 28. tjednu trudnoće zbog prerane rupture membrane. Fekalni uzorci sakupljeni su od 5.-21. dana i tijekom tog perioda dijete je bilo različito tretirano. Sekvenciranjem bakterijskog 16S rRNA gena od prikupljenih 15 fekalnih uzoraka otkrivene su 3 različite zajednice (Morowitz i sur., 2010).

U razdoblju od 5.-9. dana, zajednica se u velikoj mjeri sastoji od rodova *Leuconostoc*, *Weissella* i *Lactococcus* (Slika 1). Rodovi *Pseudomonas* i *Staphylococcus*, koji su rijetki 8. i 9. dan, postaju zastupljeniji 10. dan. U razdoblju od 10.-13. dana bogatstvo vrsta opada, a prevladava porodica *Pseudomonadaceae* (Morowitz i sur., 2010).

Nakon nastavka hranjenja djeteta, na 13. dan se pojavljuju svojste karakteristike za sljedeću fazu. Od 16.-21. dana dolazi do porasta bogatstva vrsta te većinu zauzima porodica

*Enterobacteriaceae* te rodovi *Citrobacter* i *Serratia*. Usporedbe sugeriraju da je dijete koje je istraživano imalo slične bakterije kao i druga nedonošad koja je istraživana jednakom metodom, osobito tijekom 1. i 3. kolonizacijske faze (Morowitz i sur.,2010).



**Slika 1.** (A) relativna brojnost 20 najdominantnijih bakterijskih vrsta u 15 fekalnih uzoraka prikupljenih od 5.-21. dana (sekvence su klasificirane na najvišu taksonomsku razinu koja bi mogla biti dodijeljena). To kice ukazuju na datume metagenomičkih istraživanja. Relevantne kliničke značajke prikazane su duž osi x. (B) glavne kordinatne analize UniFrac udaljenosti izmeđ u fekalnih mikrobioma prikazane u nedavno objavljene ankete za odrasle (3,5,47), dojenčadi (5) te nedonošađadi (17,19). Svaki krug prema boji odgovara sekvenci gena za 16S rRNA. Uzorci (crni krugovi) su označeni po danu. Postotci varijacija prikazani su na osima. U dojenčadi se velika promjena crijevnog mikrobioma dogodila između 9. i 15. dana (Morowitz i sur., 2010).



### 3.2. METAGENOMI KA OBRADA PODATAKA

Pokušaji da se podudaraju crijevne mikrobne zajednice u nedonošadi dale su proturječne rezultate. Npr. u nekim istraživanjima, djeca sa i bez nekrotizirajućeg enterokolitisa su imala iste vrste bakterija, dok su ostali uzorci dojenčadi s tom bolešću bili bogatiji pojedinim vrstama (npr. *Clostridium perfringens* ili red *Proteobacteria*).

Identificirane su 3 glavne sekvence za rodove *Serratia*, *Citrobacter* i *Enterococcus* koji su definirani u 3. fazi kolonizacije. *Citrobacter* je otkriven u uzorcima iz fekalija u troje od četvero djece s nekrotizirajućim enterokolitisom, ali niti u jednom od 17 kontrolnih uzoraka. Iako postoji mogućnost da je *Citrobacter* uzročnik nekrotizirajućeg enterokolitisa, njegova prisutnost u uzorcima bez ove bolesti daje poteškoće u povezivanju bakterija i bolesti (Morowitz i sur., 2010).

Genomi roda *Serratia* (soj UC1SER) dominiraju u zajednici genomskih skupina podataka iz 3. faze. Otkrivene su iznimno niske razine sekvenci nukleotida UC1SER. UC1SER je u usporedbi s genomima *Serratia proteamaculans* i *Serratia marcescens*, koje su patogene te su poznat uzrok bolesti kod nedonošadi. *Serratia proteamaculans* je bakterija koja se rijetko nalazi u ljudskom uzorku. Unutar regija UC1SER postoje male skupine gena koje se javljaju i drugdje u *S. marcescens* i *S. proteamaculans*. Te skupine kodiraju proteine koji su uključeni u biosintezu fimbrija, transport nitrata, općenito metabolizam, biosintezu aminokiselina i slično (Morowitz i sur., 2010). Dakle, ta područja mogu doprinijeti metaboličkoj varijaciji kako bi se razlikovale ove vrste. Samo UC1SER sadrži operon gena *PGA* uključeni u sintezu polisaharidaza, adhezijski biofilm te regulon za korištenje alantoina. Također sadrži i operon gena *yjf-sga* koji omogućuje nekim sojevima bakterija u crijevu upotrebu C vitamina kao izvora energije (Morowitz i sur., 2010).

### 3.2.1. ANALIZA SOJEVA CITROBACTER

Na temelju sekvenci gena za 16S rRNA, *Citrobacter* u 3. fazi kolonizacije je usko povezan s *Citrobacter freundii*. Rod *Citrobacter* ine fakultativni anaerobi iz porodice *Enterobacteriaceae*. Kao i *Serratia*, esti su patogeni u nedonoš adi. *Citrobacter* 30\_2 izoliran je u djeteta s meningitisom (Morowitz i sur., 2010).

UC1CIT soj je dominantan soj roda *Citrobacter* 30\_2 izoliranog od djeteta s meningitisom. Soj UC1CIT ima brojne gene pogodne za rast na raznim podlogama. Na temelju relativne u estalosti soja, skup podataka za 10.,16.,18.,21. dan je pokazao da UC1CIT ini 77% udjela roda *Citrobacter*. Postoji i soj UC1CIT-II. Geni toga soja uklju uju mnoge fimbrijske gene te omogu uju transport fruktoze i drugih še era (Morowitz i sur., 2010).

### 3.2.2. ENTEROCOCCUS

Brojnost roda *Enterococcus* jako raste tijekom 3. faze kolonizacije. Sekvence gena za 16S rRNA soja UC1ENC je identi na onima iz nekoliko izolata *Enterococcus faecalis*. Uspore ene su sekvence od 7 UC1ENC gena sa sekvencama gena koji se koriste u MLST (*multilocus sequence typing*) analizi izolata te je utvr eno da je soj UC1ENC bio identi an u svih 7 MLST lokusa sekvence tipa 179 (Morowitz i sur., 2010).

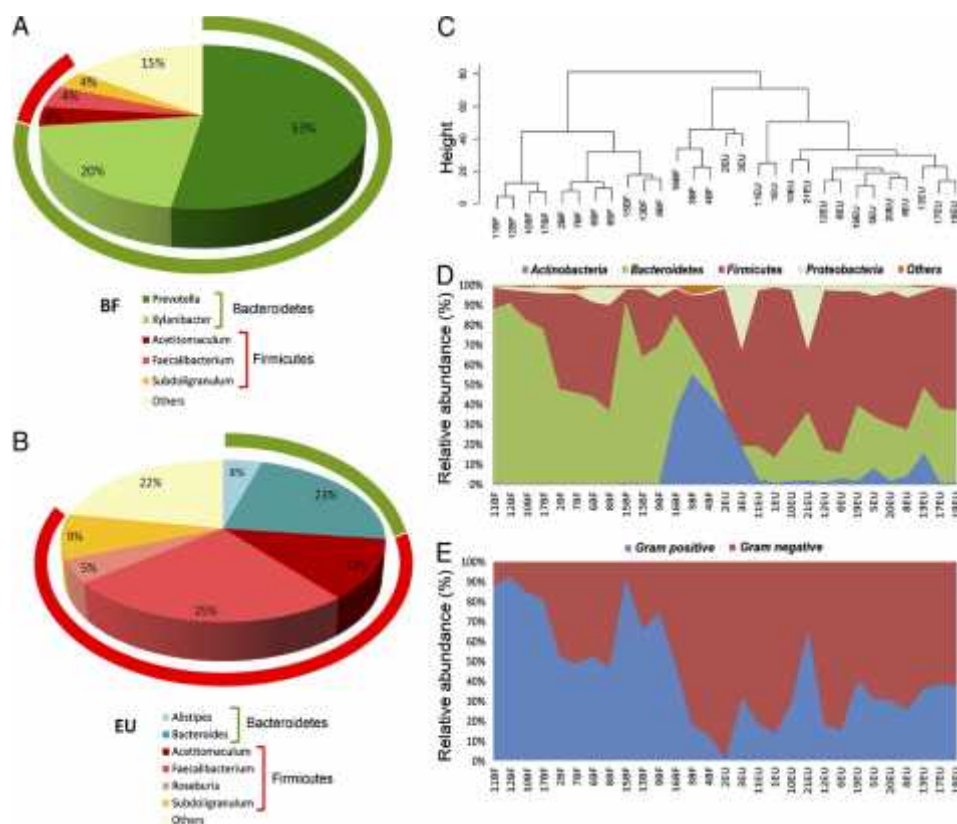
#### **4. UTJECAJ PREHRANE U OBLIKOVANJU CRIJEVNOG MIKROBIOMA KOD DJECE IZ EUROPE I AFRIKE**

Crijevni mikrobni sastav ovisi o različitim prehranbenim navikama. U ovom istraživanju uzeti su fekalni uzorci 14 zdrave djece iz ruralnog afričkog mjesta u Burkini Faso (BF) te 15 uzoraka djece iz Firence, Italija (IT). Korištenjem visoko-protokalne 16S rDNA sekvencijske i biokemijske analize, utvrđene su značajne razlike u crijevnim mikrobiomima te dvije grupe. Prehrana djece iz Burkin Faso je siromašna masnoćama i životinjskim proteinima, a bogata škrobom, vlaknima i biljnim polisaharidima. Nasuprot tome, djeca iz Firence imaju prehranu bogatu životinjskim bjelanjcima, škrobom, šećerima i masnoćama, a siromašnu vlaknima (De Filippo i sur., 2010).

##### **4.1. DOMINACIJA BACTEROIDETES U DJECE IZ BURKINE FASO U USPOREDBI S DJECOM IZ ITALIJE**

Kako bi se karakterizirale bakterijske skupine prisutne kod fekalnih uzoraka mikrobioma ovih 29 uzoraka, provelo se višestruko sekvencioniranje hipervarijabilnih regija V5 i V6 u gena za 16S rRNA. U više od 94,2 % svih BF- i IT- uzoraka utvrđeno je da sadržavaju četiri najzastupljenija bakterijska koljena: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria* (De Filippo i sur., 2010).

Značajne razlike pronađene su u omjerima tih četiriju koljena bakterija u djece iz Afrike i Europe: *Actinobacteria* i *Bacteroidetes* su više zastupljene u BF- nego u IT-djece, dok *Firmicutes* i *Proteobacteria* prevladavaju kod IT-djece. Statistička analiza, koristeći parametarski test (ANOVA) pokazuje da *Firmicutes* i *Bacteroidetes* značajno razlikuju djecu iz Afrike i Europe. Dakle, *Firmicutes* prevladava dvaput više kod djece iz Europe u odnosu na djecu iz Afrike što upućuje na različite bakterijske kolonizacije ljudskog crijeva u dvije populacije. Zanimljivo, rodovi *Prevotella*, *Xylanibacter* (*Bacteroidetes*) i *Treponema* (*Spirochaetes*) su prisutni isključivo kod afričke djece iz Burkin Faso (Slika 2). Možemo pretpostaviti da bi prisutnost ova 3 roda mogla biti posljedica uzimanja velike količine vlakana (De Filippo i sur., 2010).



**Slika 2.** Geni za 16S rRNA pokazuju jasno razdvajanje dviju populacija istraživane djece. (A i B) Prikazane su srednje vrijednosti bakterijskih rodova prisutnih u fekalnim uzorcima djece iz Burkine Faso (BF) i Italije (IT). *Bacteroidetes* (zeleno) i *Firmicutes* (crveno) predstavljaju red za svaki od naj eš e zastupljenih rodova. (C) dendrogram sa hijerarhijskim grupiranjem uzoraka BF- i IT- populacije na temelju njihovih rodova. (D) postotak sekvenci od etiri najbrojnije bakterijske skupine izme u BF- i IT-djece. Plava podru ja u sredini pokazuju obilje *Actinobacteria*, uglavnom roda *Bifidobacterium*. (E) postotak sekvenci Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija u svakog pojedinca. Razli ite distribucije Gram- i Gram+ bakterija u BF- i IT-populacije odražavaju razlike u dvije najzastupljenije skupine bakterija, *Bacteroidetes* i *Firmicutes* (De Filippo i sur., 2010).

## 4.2. OMJER FIRMICUTES / BACTEROIDETES (F/B)

Uzeti su uzorci 5 najmlađe djece iz Afrike i Europe. BF-djeca su dojena do dobi od dvije godine, a IT-djeca do jedne godine starosti. U BF-djece je jako zastupljena skupina *Actinobacteria* i to uglavnom rod *Bifidobacterium*, koji je pronađen i kod ispitanika IT-djece i poznato je da se strogo odnosi na dojenje dojenadi. Ovaj rezultat je jasan pokazatelj dominantne uloge prehrane u oblikovanju mikrobnog crijevnog sastava (De Filippo i sur., 2010).

Omjer F / B razlikuje pretilost od mršavijih ljudi. Porast F / B omjera kod IT-djece vjerojatno je potaknut visokom kaloričnom prehranom, pa se omjer može smatrati "biomarkerom pretilosti". Ljudski crijevni mikrobiomi prolaze faze sazrijevanja od rođenja do odrasle dobi i starenja, s posebnim naglaskom na F / B omjer, koji se razvija u različitim fazama života. Kao posljedica različitih F / B omjera u dvije populacije, nađene su Gram-negativne bakterije (uglavnom *Bacteroidetes*) koje su više zastupljene od Gram-pozitivnih bakterija u BF-djece (58,5 % : 37,4 %), dok su Gram-pozitivne (uglavnom *Firmicutes*) više zastupljene od Gram-negativnih u IT-djece (70,4 % : 29,1 %) (De Filippo i sur., 2010).

## 4.3. BOGATSTVO MIKROORGANIZAMA I BIOLOŠKA RAZNOLIKOST

Koriste i se neparametrijskim testom za usporedbe Kruskal Wallis, pronađene su značajne razlike bogatstva i biološke raznolikosti u crijevu između BF- i IT-djece. BF-djeca imaju znatno veći lanac masnih kiselina u usporedbi s IT-djecom. Posebice, propionska i maslačka kiselina su gotovo četiri puta više zastupljene u uzorcima BF, nego IT, dok su octena i valerijanska kiselina usporedive u obje skupine (De Filippo i sur., 2010).

Rezultati ukazuju da prehrana bogata biljnim polisaharidima te siromašna šećerima i masnom kiselom utječe na sintezu kratkih lanaca masnih kiselina. Stoga možemo pretpostaviti da mikrobiom koevolucira s prehranom BF-populacije. Rezultati sugeriraju da prehrana ima dominantnu ulogu te se može pretpostaviti kako potrošnja šećera, masti, kalorija... u razvijenim zemljama ograničava adaptivni potencijal mikrobioma (De Filippo i sur., 2010).

## 5. UTJECAJ CRIJEVNOG MIKROBIOMA NA RAZVOJ MOZGA I PONAŠANJE

U ovom istraživanju testirana je hipoteza da je normalni crijevni mikrobiom sastavni dio vanjskih okolišnih signala koji moduliraju razvoj mozga i njegove funkcije. *Germ-free* (GF) i *patogen-free* (SPF) su miševi s normalnim crijevnim mikrobiomom i u ovom su eksperimentu podvrgnuti testu istraživanja njihove aktivnosti i anksioznosti (Diaz Heijtz i sur., 2010).

Miševi su bili smješteni u kutiji i pratilo se njihovo ponašanje. Nakon nekog vremena utvrđene su znatne razlike između ove dvije skupine miševa. GF-miš je pokazao ukupno više i prije nego put te se znatno više kretao u odnosu na SPF-miša. Također, istraživana je hipoteza jesu li nepatogeni crijevni mikrobiomi utjecali na ponašanje poput anksioznosti. U tu svrhu su korištena dva testa anksioznosti: svijetlo-tamna kutija i povišeni plus-labirint test. U svijetlo-tamna kutija testu GF-miš je proveo znatno više vremena u svijetlom dijelu kutije nego SPF-miš. U testu povišeni plus labirint GF-miš je proveo više dijelova na otvorenom dijelu kutije od SPF-miša. Također su testirani i CON-miševi dobiveni od SPF-miševa. U svijetlo-tamna kutija testu ponašanje CON-miševa bilo je slično GF-miševima te različit od SPF-miševa. U povišenom plus-labirint testu CON-miševi su promijenili ponašanje (Diaz Heijtz i sur., 2010).

### 5.1. UTJECAJ NORADRENALINA (NA), DOPAMINA (DA) I 5-HT-a U STRIJATUMU MIŠEVA

Istraživane su potencijalne promjene u neurokemiji novog seta GF-miševa. Koncentracije NA, DA i 5-HT-a te njihovih glavnih metabolita: 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG), dihidroksifeniloctene kiseline (DOPAC), homovanilne kiseline (HVA) i 5-hidroksiindolactene kiseline (5-HIAA) mjerene su u frontalnom korteksu, strijatumu i hipokampusu GF- i SPF-miševa. Koncentracije NA, DA i 5-HT-a su bile znatno veće u strijatumu GF-miševa u usporedbi sa SPF-miševima, dok u frontalnom korteksu i hipokampusu nisu nađene razlike (Diaz Heijtz i sur., 2010).

### **5.1.1. EKSPRESIJA SINAPTI KO-PLASTI NIH SRODNIH GENA U MIŠEVA**

S obzirom da je dopamin važan regulator motornih i kognitivnih funkcija, istražena je ekspresija dopaminskih receptora (D1 i D2) te unutarstanični signalni mehanizmi (npr. DARPP-32) u strijatumu, frontalnom korteksu i hipokampusu. U GF-miševa DA D1 receptora mRNA bio je znatno viši u hipokampusu, a niži u strijatumu u usporedbi sa SPF-miševima. Nije bilo razlike u unutarstaničnim signalnim mehanizmima npr. DARPP-32 ili DA D2 receptora između GF- i SPF-miševa (Diaz Heijtz i sur., 2010).

### **5.1.2. UTJECAJ MIKROBNE KOLONIZACIJE NA PROTEINSKU EKSPRESIJU U MIŠEVA**

Nakon što je utvrđeno da normalni crijevni mikrobiom modificira ponašanje i ekspresiju gena u ključnim regijama mozga, istraženi su i neki drugi geni koji bi mogli imati važnu ulogu. Istražen je proteinski izraz PSD-95 i sinaptofisin u frontalnom korteksu, strijatumu i hipokampusu GF-, SPF- i CON-miševa (Diaz Heijtz i sur., 2010).

Ekspresija sinaptofisina i PSD-95 u strijatumu je znatno niža u SPF- i CON-miševa u usporedbi s GF-miševima. Međutim, nije bilo razlike u ekspresiji sinaptofisina ili PSD-95 u frontalnom korteksu i hipokampusu. Sinaptofisin i PSD-95 smatraju se neizravnim markerom u razvoju mozga. Modulacija hormona stresa (npr. ACTH i kortikosterona) je još jedan potencijalni mehanizam koji bi mogao objasniti sadašnje nalaze. Drugi mogući mehanizam komunikacije između mozga i crijevnih mikrobiota može biti uspostavljen putem neurona. Razlike koje su se promatrale između GF- i SPF-miševa posredovane su signalizacijom ubrzo nakon rođenja miševa, kada postaju izloženi crijevnom mikrobiomu (Diaz Heijtz i sur., 2010).

## 6. ZAKLJUČAK

Crijevni mikrobiom ima vrlo važnu ulogu u organizmu te može utjecati na razne faktore. Već po rođenju, ljudi su naseljeni raznim oblicima bakterija koji se kasnije tijekom razvoja modificiraju ovisno o životnim navikama, od kojih su najvažnije prehrambene navike, pa su ovisno o tome razne populacije naseljene različitim oblicima mikroorganizama jer upravo prehrana definira bakterijske vrste koje će biti zastupljene u organizmu. Najzastupljenije bakterijske skupine koje se javljaju kod ljudi jesu: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria* te se ovisno o navikama kod raznih populacija javljaju u različitim omjerima. Crijevni mikrobiom je povezan sa urođenim imunološnim odgovorom te tijekom diferencijacije utječe na razvoj mnogih struktura kao npr. na razvoj mozga i ponašanje miševa te na ekspresiju određenih gena koji imaju ulogu u ponašanju i razvoju. Može biti povezana i sa raznim bolestima kao što je npr. nekrotizirajući enterokolitis u dojenčadi pri čemu su neka djeca bila obogaćena za neke bakterijske vrste.



## 7. SAŽETAK

Bakterije su jednostanični organizmi koji nemaju jezgru i organele te se ubrajaju u prokariote. U intestinalnom traktu prevladavaju anaerobne bakterije s obzirom da nema mnogo kisika. U prvom dijelu navedenih istraživanja proučavan je mikrobiom usne šupljine. Provedena je analiza 1179 svojti koje su identificirane po svojoj sekvenci za 16S rRNA s ciljem da se unesu u bazu podataka usnog mikrobioma pod nazivom HOMD. Zatim su prikazana istraživanja mikrobioma fekalnih uzoraka ženskog dojenčeta. S obzirom na tretiranje djeteta, u različite dane se pojavljuju različite skupine bakterija. Mikrobni sastav u intestinalnom traktu također znatno ovisi o prehranbenim navikama. U trećem dijelu prikazanih istraživanja analizirana je bakterijska raznolikost u fekalnim uzorcima djece iz ruralnog sela Afrike i urbanog središta Europe. S obzirom na različite prehranbene navike pronađene su različite skupine bakterija u dvije populacije, no u obje populacije četiri najzastupljenije bakterijske skupine su: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. U zadnjem djelu prikazanih istraživanja proučeno je kako crijevni mikrobiom utječe na razvoj mozga, njegove funkcije i ponašanje u dvije vrste miševa (GF i SPF). Pronađene su znatne razlike između dvije skupine miševa kao što je kretanje, zatim razlike u razini noradrenalina, dopamina, 5-HT-a, sinaptofisina, PSD-95 i slično.

## 8. SUMMARY

Bacteria are single-celled organisms that do not have a nucleus and organelles and hence are classified as the prokaryotes. The human intestinal tract is dominated by anaerobic bacteria since there is not much oxygen. The first of the reviewed studies investigated the oral microbiomes. The analysis of 1179 species that are identified by their 16S rRNA sequences in order to be entered into a database called Human Oral Microbiome Database (HOMD). The second study presented here investigates fecal samples microbiomes of a female infant. Depending on a treatment of the child, different groups of bacteria appear sequentially on daily basis. The microbial composition of the intestinal tract is also highly dependent on dietary habits. In the third reviewed study fecal samples from children in rural villages in Africa and urban centers of Europe were compared regarding the microbe diversity. Different dietary habits in two populations of children affected their microbe diversity, but both populations contain the four most common groups of bacteria, namely: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The last reviewed paper brings research on how intestinal microbiome affects the developing brain, its function and behavior in *germ-free* (GF) and *pathogen-free* (SPF) mice. Significant differences in motor abilities, noradrenaline, dopamine, 5-HT, synaptophysin and PSD-95 levels were found between the two groups of mice.

## 9. LITERATURA

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poulet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. (2010): Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14691-14696

Dewhirst, E.F., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W.H., Lakshmanan, A., Wade, W.G. (2010): The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192: 5002-5017

Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., Pettersson, S. (2010): Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 3047-3052

Morowitz, M.J., Deneff, V.J., Costello, E.K., Thomas, B.C., Poroyko, V., Relman, D.A., Banfield, J.F. (2010): Strain-resolved community genomic analysis of gut microbial colonization in a premature infant. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1128-1133

<http://dira.forums-free.com/bakterije-mikroorganizmi-u-gastrointestinalnom-traktu-t493.html>

[www.homd.org](http://www.homd.org)

<http://vijesti.gorila.hr/gorilopedija/lifestyle/zdravlje/bakterije>

<http://www.zdrav-zivot.com.hr/index.php?cat=probiotici>